

Корепанова Е.А.

Трансмембранный перенос веществ и биоэлектrogenез

Лекции для студентов МБФ



Лекция № 5. Электрическая активность одиночных ионных каналов.

1. Методы обнаружения одиночных ионных каналов.
 - 1.1. Метод БЛМ.
 - 1.2. Пэтч-клэмп клеточных мембран.
2. Получаемая информация
 - 2.1. Проводимость ионного канала.
 - 2.2. Кинетика работы ионного канала.
 - 2.3. В–а характеристика канала.
3. Типы структур ионных каналов.
4. Заключение. Для чего нужно изучать каналы.
 - 4.1. Каналы и болезни
 - 4.2. Каналы как антибиотики
 - 4.3. Каналы и биотехнологии.
 - 4.4. Каналы как необходимый механизм выживания

1. Методы обнаружения одиночных ионных каналов

Ионные каналы позволяют клетке регулировать проницаемость мембран для тех или других ионов, а это лежит в основе возбудимости клеток и ионной регуляции внутриклеточных процессов

Основной метод изучения работы ионных каналов – это измерение ионных токов через мембрану при определенном мембранном потенциале и известных концентрациях ионов по обе стороны мембраны. Методика регистрации ионных токов достаточно хорошо разработана и при наличии соответствующих измерительных приборов легко осуществима.

Однако при изучении интегральных ионных токов через открытые в мембране калиевые или натриевые каналы, на фоне высокой интегральной проводимости мембраны, создаваемой многими открытыми каналами, дискретные, малые изменения, проводимости одиночного канала неразличимы. В этом случае обнаружить каналы в мембране удастся только по косвенным признакам, например при переменном электрическом напряжении на мембране. Подобные эксперименты проводились на модельных фосфолипидных мембранах. Для того чтобы выяснить, каков механизм переноса электрического заряда через мембрану: с помощью подвижных переносчиков или через каналы изучалась зависимость мембранной электропроводности от концентрации электролита в окружающей среде.

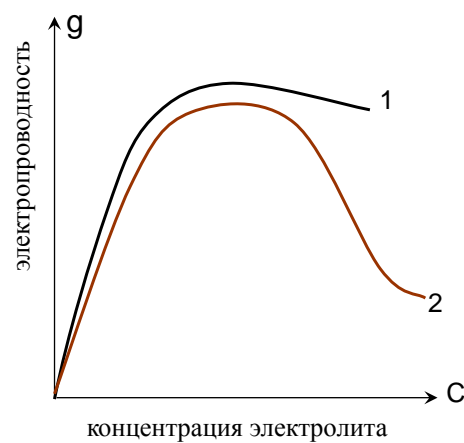
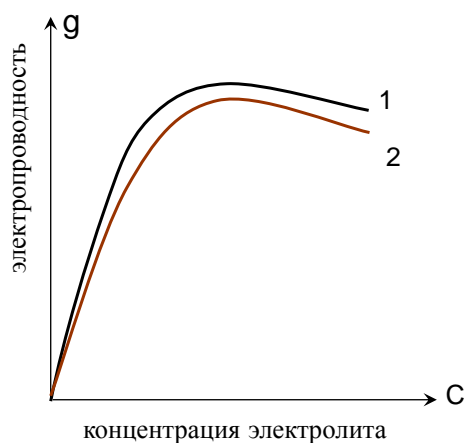


Рис.12. Проводимость мембраны, в которой присутствуют ионные каналы (2) или переносчики ионов (1), на постоянном токе. Рис.13. Проводимость мембраны, в которой присутствуют ионные каналы (2) или переносчики ионов (1), на переменном токе.

При постоянном электрическом токе проводимость мембраны в зависимости от концентрации электролита, как в случае переносчиков, так и при наличии каналов, имеет вид немонотонной кривой с насыщением (рис.12). Насыщение обусловлено либо насыщением каналов переносимым ионом при высокой концентрации электролита, либо отсутствием свободной формы переносчика (насыщением переносчиков) в мембране (рис.12, кривые 1 и 2).

Однако если электрическая проводимость мембраны появляется в результате одновременной работы многих каналов, то при использовании переменного электрического напряжения с ростом концентрации электролита наблюдается её снижение и даже блокирование рис.13. Это указывает на уменьшение или полную

непроводимость каждого из многих открытых единичных каналов, Причина в том, что при высокой концентрации электролита выход иона из канала затруднен. В этих условиях при подаче на мембрану переменного напряжения ион просто не успевает покинуть канал, что приводит к блокированию трансмембранного ионного тока (рис.13, кривая 2). В то время как заряженные комплексы, например K^+ -валиномицин, при высокой концентрации электролита и любой частоте переменного электрического напряжения могут двигаться внутри мембраны в любом направлении, то есть зависимость тока от концентрации по-прежнему имеет вид кривой с насыщением.

Прямое обнаружение функционирующих одиночных ионных каналов в мембране по их электрической активности стало возможным при разрешении следующих методических проблем.

Во-первых, для непосредственного обнаружения ионных каналов необходим прибор, с помощью которого можно зарегистрировать малые токи, протекающие через одиночные ионные каналы, то есть токи порядка нескольких пикоА (10^{-12} А) при частоте не менее 1 кГц. При этом подаваемый на мембрану электрический потенциал, обеспечивающий ионный ток в канале, должен не искажаться в результате перераспределения подаваемого на мембрану напряжения между элементами электроизмерительной схемы, возникающего в результате шунтирования мембраны в момент открытия ионного канала. С этой целью используется прибор, называемый операционным усилителем с обратной связью. Это специальный управляющий потенциалом источник напряжения, который поддерживает на мембране постоянную заданную разность электрических потенциалов.

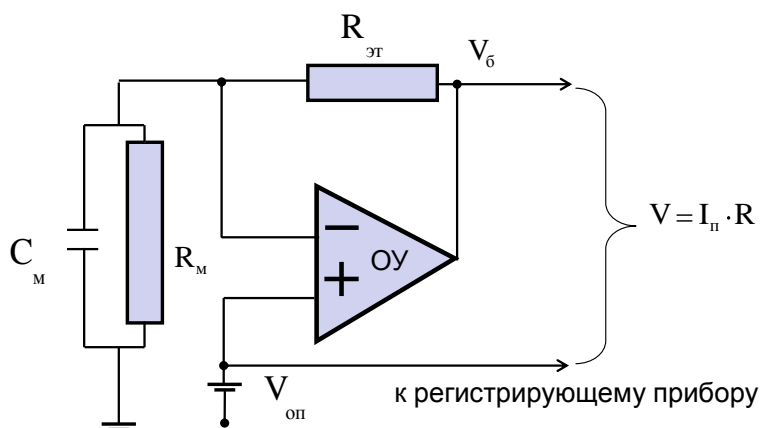


Рис. 14. Принципиальная эквивалентная электрическая схема измерения ионных токов в режиме фиксации электрического потенциала на мембране на заданном уровне: $R_{эт}$ – эталонное сопротивление; R_M и C_M – соответственно электрическое сопротивление и электрическая емкость мембраны; ОУ – дифференциальный усилитель с высоким коэффициентом усиления, на вход которого подается разность потенциалов, между измерительным электродом и электродом сравнения. $V_{оп}$ – командный потенциал.

Метод фиксации потенциала на клеточной мембране первоначально использовался в работе с мембранами электровозбудимых клеток (гигантский аксон кальмара, гигантский нейрон улитки, мембраны харовых водорослей и др.), а затем стал применяться и при

изучении искусственных мембран, преимущественно плоских бислойных липидных мембран (БЛМ), в которые встраивались каналобразующие соединения и комплексы.

2.1. Метод БЛМ

При изучении электрической активности ионных каналов очень удобно проводить опыты на модельных фосфолипидных мембранах. Как правило, в этих экспериментах используются так называемые плоские бислойные липидные мембраны (БЛМ). Используя методику фиксации электрического напряжения на БЛМ, можно регистрировать не только интегральный ионный ток, но и токи, проходящие через единичный канал. Дело в том, что в модельную мембрану можно встроить малое количество каналов, при котором, благодаря их асинхронному открыванию и закрытию, можно регистрировать токи, протекающие через единичные ионные каналы. На рис. 15 представлена схема формирования таких мембран.

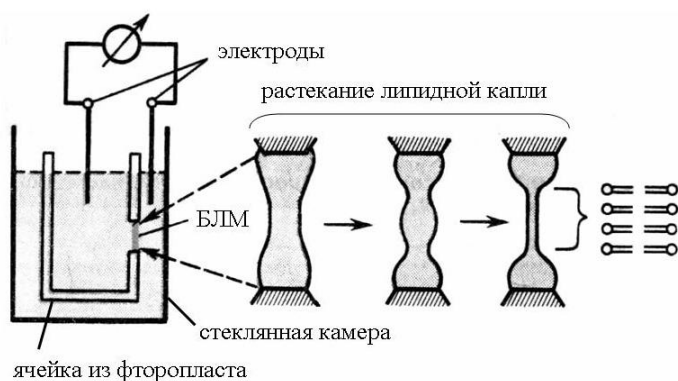


Рис. 15. Схема формирования БЛМ из липидной капли. В область отверстия (диаметром не более 1,3 мм) в стаканчике, изготовленном из гидрофобного материала (фторопласт, полиэтилен), впрыскивают каплю раствора фосфолипидов, как правило, в *n*-декане или гептане. Однако не исключено использование других растворителей.

Формирование БЛМ начинается с истончения толстой липидной капли. Главными силами, определяющими поведение капли, являются межфазное (поверхностное) натяжение, σ , и ван-дер-ваальсовы силы притяжения водных фаз по обе стороны от капли, сжимающие ее в поперечном направлении (расклинивающее давление).

За процессом формирования тонкой, бислойной, плёнки можно наблюдать визуально в отражённом свете. Пока пленка толстая она выглядит, как обычное макротело. При толщине пленки, соизмеримой с длиной волны падающего света, начинается интерференция лучей, отражаемых от её передней и задней поверхностей. На поверхности плёнки появляются цветные узоры, так называемые кольца Ньютона. Такие пленки, содержащие линзоподобные утолщения, получили название цветных плёнок.

В отраженном свете бислойные липидные структуры выглядят черными на светлом фоне камеры, поэтому их называют «черными». Низкая отражающая способность черных пленок обусловлена тем, что отражаемые от передней и задней поверхностей пленки лучи находятся в противофазе и гасят друг друга.

Формирование черной пленки не означает полного завершения всех процессов превращения липидной фазы в бислойную мембрану (БЛМ). Параллельно с почернением пленки идут более длительные процессы растекания растворителя по стенке в области

По ряду физико-химических свойств бислойные липидные мембраны, приготовленные из природных фосфолипидов, близки к параметрам биологической мембраны (табл.1) .

Таблица 1. Сравнение биомембран и БЛМ по их физическим свойствам

Свойство	Биомембраны	БЛМ
Вид на снимке поперечного среза, получаемый с помощью электронного микроскопа	3-х слойная структура	3-х слойная структура
Толщина, нм	6,0÷10	2,5÷8,0
Межфазное натяжение, н.см	$(0,03÷3,9) 10^{-5}$	0,2÷6,0
Электрическое сопротивление, Ом/см ²	$10^2÷10^5$	$10^6÷10^9$
Электрическая ёмкость, мкФ/см ²	0,5÷1,3	0,2÷1,0
Напряжение электрического пробоя, мВ	100	150÷300
Показатель преломления	1,6	1,56÷1,66
Проницаемость для воды, мкм/с	0,5÷400	31,7
Энергия активации водной проницаемости, кДж/моль	40,3	53,3
Ионная избирательность, P_{K^+}/P_{Na^+}	1÷25	5,4÷9,0

В то же время искусственные липидные плёнки отличаются от биологической мембраны низкой электрической проводимостью, лишены метаболической активности и не обладают столь высокой ионной селективностью, как биологические мембраны.

Многие из этих свойств могут быть приданы искусственным мембранам путем введения в их состав разнообразных мембраноактивных соединений и отдельных функционально важных элементов биологических мембран. В присутствии таких модификаторов электрическая проводимость мембран обычно возрастает. Все это свидетельствует о том, что бислойная липидная структура играет роль естественной матрицы для многих молекулярных компонентов биологической мембраны и что липидный бислой в той или иной степени свойственен природным мембранам.

Широкий спектр применения различных электроизмерительных методов для изучения БЛМ, возможность изменять липидного состава БЛМ и состав внешней среды, наличие методики формирования БЛМ из отличающихся монослоев фосфолипидов с целью придания мембране ассиметричности, присущей биомембранам, – обеспечило этим модельным мембранным системам одно из центральных мест в изучение функциональной активности ионных каналов. Данный метод формирования мембран относительно прост в исполнении и позволяет встраивать в мембрану необходимое для хорошего разрешения количество каналов. Вклад, который внёс данный метод в современную науку о функционировании каналов, невозможно переоценить.

2.2. Пэтч–клэмп клеточных мембран

При фиксации потенциала на мембране можно зарегистрировать ток, проходящий через единичный канал, только в том случае, когда электропроводность канала соизмерима с электропроводностью мембраны. Однако в биологической мембране одновременно работает много каналов. Поэтому наблюдать за работой единичного канала не удавалось вплоть до появления методики выделения участка нативной мембраны с малым числом каналов в нём. В решение этой методической проблемы неоценимый вклад внесли западногерманские ученые Нейер и Сакман, которые в 1976 году предложили метод регистрации электрической активности каналов в биомембранах, получивший название «пэтч–клямп». Идея метода состояла в создании методики, позволяющей максимально уменьшить площадь изучаемого участка мембраны (рис.16). Это существенно увеличивало отношение «полезный сигнал–шум» и позволяло регистрировать ток, протекающий через один ионный канал. Окончательную завершенность метод получил в 1981 году, когда были решены проблема создания плотного контакта между небольшим участком клеточной мембраны и поверхностью регистрирующего сигнал электрода (в противном случае сигнал шунтируется на землю) и проблема анализа большого массива данных с помощью пакета программ ЭВМ.

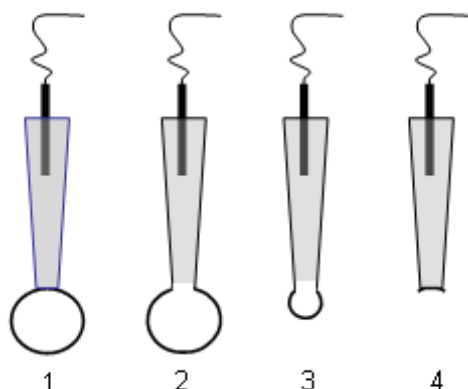


Рис. 16. Различные конфигурации методики фиксации участка биологической мембраны, используемые при изучении электрической активности ионных каналов в клеточной мембране..

В конфигурации 1 (“cell attach”) к поверхности клетки подводится стеклянная пипетка с оплавленными краями, диаметром 0,5-1 мкм. Пипетка заполняется концентрированным раствором хлорида калия и соединена с усилителем тока. К внутренней части пипетки прикладывается отрицательное давление. Между поверхностью клетки и краями кончика пипетки образуется плотный контакт, с сопротивлением утечки $1 \div 10 \cdot 10^9 \text{ Ом}$, или $(1 \div 10)$ гигаОм. Конфигурация 1 позволяет исследовать нативную клетку, не разрушая её, однако она недостаточно информативна, так как не позволяет варьировать вещества, подаваемые к клеточной мембране.

После разрушения участка мембраны под пипеткой можно регистрировать токи от всей клетки, как с микроэлектродами (конфигурация 2 “whole cell recording”). В этом случае можно регистрировать токи от клеток очень малых размеров (5-10 мкм).

При плавном отведении пипетки от клетки в конфигурации 2 образуется перетяжка, а затем маленькая везикула, содержащая всего несколько каналов (конфигурация 3). В данной конфигурации можно изучать работу одиночных каналов при смене

фармакологических веществ у наружной части мембраны. Кроме того, в данной конфигурации система имеет хорошую устойчивость к вибрациям.

Наконец, если в конфигурации 1 резко отвести пипетку от клетки, то на кончике пипетки образуется маленький фрагмент мембраны с её внутренней частью, обращенной наружу (Конфигурация 4 “inside out”). Оторванный от клетки фрагмент мембраны может содержать всего один или несколько ионных каналов. Конфигурация 4 позволяет подавать вещества к внутренней части мембраны и регистрировать работу отдельных каналов, её характеризует высокая устойчивость к вибрациям.

Таким образом, метод «рэтч-клямп» позволяет исследовать 1) электрическую активность отдельной клетки малых размеров, 2) регистрировать работу отдельных каналов, 3) исследовать действие фармакологических веществ при их добавлении в окружающую среду, как с внутренней, так и с наружной стороны мембраны.

3. Получаемая информация

3.1. Электропроводность одиночного ионного канала

Функционирование каналов проявляется в виде дискретных флуктуаций тока, характерной прямоугольной формы (рис.17,18) .

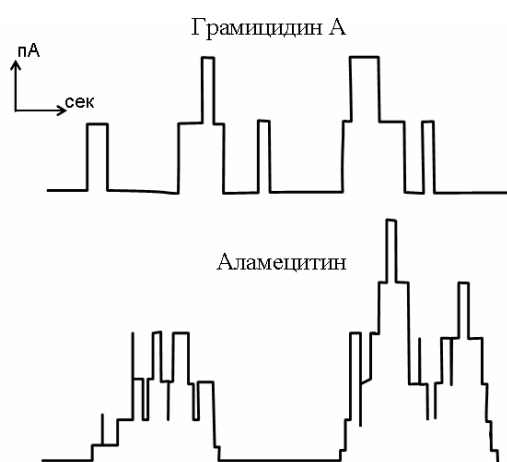


Рис. 17. Одиночные ионные каналы, формируемые в искусственных липидных мембранах (БЛМ) пептидными антибиотиками. Схематическое изображение записи тока при фиксированном напряжении.

На рис. 18 приводится пример типичных записей флуктуаций токов, возникающих в отрицательно заряженных БЛМ в присутствии поликатионного пептидного антибиотика полимиксина В.

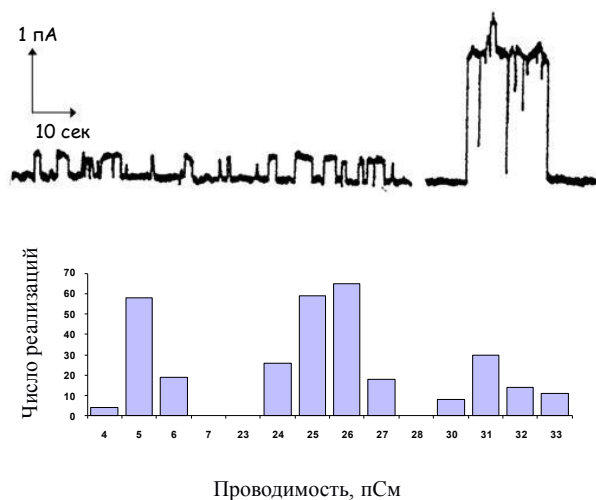


Рис. 18. Типичные флуктуации тока, индуцируемые пептидным антибиотиком полимиксином В в отрицательно заряженных липидных мембранах и гистограмма их проводимостей. Напряжение 70 мВ.

Пропускная способность (проводимость) каналов оценивается в пико Сименс (пико = 10^{-12}). Сименс – величина обратная Ом. Проводимость одиночных каналов составляет, как правило, десятки пико См, редко – единицы или сотни пико См. Проводимость канала легко рассчитать, разделив ток канала на величину приложенного напряжения.

Для одного сорта каналов проводимость – величина постоянная. Однако, построив гистограмму проводимостей среди них, как правило, можно выделить минимальный импульс и импульсы, кратные минимальному импульсу. Появление импульсов тока, кратных минимальному импульсу, по-видимому, связано с одновременной работой нескольких каналов.

Возможна также ситуация, когда один тип каналов имеет несколько уровней проводимости, что обусловлено изменением конформационной структуры канала при вхождении в него ионов. Примером такого канала является пептидный антибиотик аламецитин (рис.17).

Уникальным свойством каналов является их селективность, то есть способность отличать определенный вид ионов, к транспорту которого они приспособлены, от всех других ионов и веществ. При этом в мембране может существовать несколько типов каналов, обладающих одинаковой селективностью, но имеющих разную проводимость. Например, в сердечной мышце есть калиевые каналы, имеющие проводимость около 10, 30, 60 и 110 пСм. Каждый из этих каналов выполняет различную физиологическую функцию в работе сердца.

3.2. Размер эффективного сечения канала

Используя гистограмму проводимостей можно рассчитать значение средней величины проводимости канала и, допуская, что канал имеет цилиндрическую форму, с помощью нехитрых вычислений оценить диаметр канала.

Полагая, что между проницаемостью мембраны и ее проводимостью в симметричном ионном окружении существует такая же зависимость как в мембране, можно написать:

$g_n = P_p \cdot C \cdot \frac{z^2 \cdot F^2}{R \cdot T}$, где g_n – проводимость поры в расчете на единицу площади ее просвета, а p_p связана с коэффициентом диффузии иона в поре D_p , коэффициентом распределения K_p иона в системе: просвет поры – вода и длиной поры ℓ обычным соотношением

$$p_p = \frac{D_p \cdot K_p}{\ell}$$

Используя дополнительные преобразования исходного уравнения, можно рассчитать диаметр канала.

В эксперименте измеряют либо проводимость мембраны в целом G_m , либо проводимость одиночного канала g_{chan} . Соотношение между этими величинами очевидно:

$G_m = n \cdot g_{chan}$, где n – число пор на единицу площади мембраны. Соотношение между g_{chan} и g_n тоже достаточно ясное:

$$g_{chan} = g_n \cdot \pi r^2, \text{ где } \pi r^2 \text{ – площадь поры, а } r \text{ – ее радиус.}$$

Окончательно выражение для проводимости ионного канала можно представить в виде:

$$g_{chan} = \frac{D_p \cdot K_p \cdot z^2 \cdot F^2}{\ell \cdot R \cdot T} \cdot C \cdot \pi \cdot r^2 \quad . \quad r_{chan} = \sqrt{\frac{g_{chan} \cdot \ell \cdot R \cdot T}{\pi \cdot D_p \cdot K_p \cdot C \cdot z^2 \cdot F^2}} = \frac{1}{z \cdot F} \cdot \sqrt{\frac{g_{chan} \cdot \ell \cdot R \cdot T}{\pi \cdot D_p \cdot K_p \cdot C}}$$

При длине канала $\ell = 6 \text{ нм}$, коэффициенте диффузии в воде $D = 2 \cdot 10^{-9} \text{ [м}^2 \cdot \text{с}^{-1}\text{]}$ (эта цифра относится к ионам K^+ , Cl^-) и температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$:

$$g_{chan} = 3948 \cdot 10^{-5} \frac{\text{Кл}^2 \cdot \text{м}}{\text{моль} \cdot \text{Дж} \cdot \text{сек}} \cdot K_p \cdot C \cdot r^2 \text{ См}$$

Оценить диаметр канала можно и несколько другим способом, если рассматривать канал как шунтирующее сопротивление, заполненное электролитом с удельной электропроводностью, равной удельной электропроводности электролита окружающей среды. Тогда электропроводность канала будет равна:

$g_{chan} = \frac{\kappa \cdot S}{\ell} \text{ См}$, где κ – удельная электропроводность электролита, которую можно рассчитать по формуле $\kappa = \lambda \cdot C$, используя табличное значение λ – электропроводность раствора одного грамм-эквивалента электролита, находящегося между двумя параллельными электродами площадью $S = 1 \text{ см}^2$ с расстоянием между ними в 1 см .

Таким образом, $g_{\text{chan}} = \frac{\kappa \cdot \pi \cdot r^2}{\ell}$ См, следовательно $r_{\text{chan}} = \sqrt{\frac{g_{\text{chan}} \cdot \ell}{\kappa \cdot \pi}}$, где r – искомый радиус канала.

Очевидно, что оба способа оценки радиуса канала допустимы только к каналам, которым соответствуют большие амплитуды флуктуаций тока, позволяющие предположить, что канал заполнен электролитом.

Диаметр подобных больших ионных каналов по оценкам разных исследований составляет 0,5 - 0,7 нм.

3.3. Кинетика работы ионного канала

Другой важный параметр канала – кинетика его работы. Каналы открываются на времена порядка 1 – 100 мсек, иногда и на более длительное время (это зависит от природы изучаемого канала), измеряемое секундами, пропуская 10^7 – 10^8 ионов в секунду. Канал открывается не всегда на одно и то же время. Закон распределения времён открытого состояния канала – экспонента, то есть канал открывается чаще на короткое время и реже – на длинное (рис. 19).

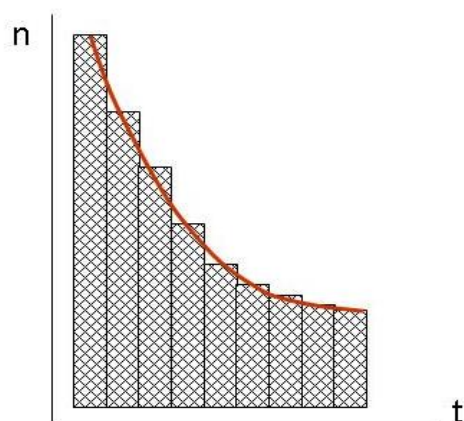


Рис.19. Гистограмма времени нахождения каналов в открытом состоянии.

Количественным параметром является среднее время открытого (или закрытого) состояния. Для его определения строятся временные гистограммы, в которых анализируется несколько сот срабатываний канала.

«Постоянная» спада получаемой экспоненты, τ , характеризует среднее время открытого состояния ионного канала. При прочих равных условиях τ является постоянной (характеристической) величиной для данного типа каналов.

3.4. Вольт-амперная характеристика канала

Зависимость амплитуды ступенек тока от мембранного потенциала φ_m (вольт-амперная характеристика) позволяет делать некоторые заключения о механизме проводимости каналов. В широких каналах эта характеристика линейна, что позволяет предположить, что в канале находится электролит и поэтому ток в таком канале описывается уравнением:

$$I = -\frac{z^2 \cdot F^2 \cdot \varphi_m}{R \cdot T} \cdot p \cdot c = z^2 F \psi \cdot p \cdot c. \text{ В растворах разных ионов линейность вольт амперной}$$

характеристики такого канала сохраняется, но имеет различную крутизну (т.е. каналы имеют разную проводимость), что позволяет выявить ион, для которого канал избирательно проницаем (Рис. 20).

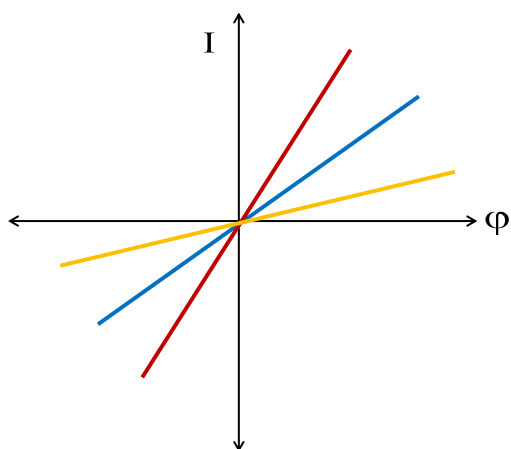


Рис.20. Вольт-амперные характеристики широкого канала, получаемые в различных электролитах.

В узких каналах вольт-амперная характеристика может быть нелинейной (эти случаи подробно рассматривались в части «Теория»). С учетом такого рода данных можно сделать ряд заключений о том, как устройство поры влияет на её ионную проводимость, а, следовательно, и на ионную проницаемость мембраны в целом.

4. Основные типы структуры ионных каналов

Поскольку каналы клеточных мембран – белковые структуры, изучение их устройства осуществляется такими же методами, какими изучается структура белков: используется рентгеноструктурный анализ, ЯМР-спектроскопия высокого разрешения, компьютерное моделирование молекулярной динамики структуры. Однако изолирование, очистка, а главное, кристаллизация интегральных мембранных белков являются сложными, дорогостоящими процедурами и для воссоздания пространственной структуры белка требуются усилия многих ученых различной специализации. Не удивительно, что на сегодняшний день можно считать установленной пространственную структуру всего лишь двух каналов: водного и калиевого канала, выделенного из клеточной стенки *E.coli*. За открытие и воссоздание структуры этих каналов двое американских ученых, Питер Эгр и Родерик МакКиннон, в 2003 году удостоены Нобелевской премии по химии.

При рассмотрении структуры ионных каналов можно выделить три основных типа каналов. Рассмотрим примеры некоторых из таких.

4.1. Чисто белковые каналы

Чисто белковые каналы пронизывают мембрану, соединяя водные фазы на противоположных сторонах мембраны. В первую очередь это – каналы биологических мембран. Внутренняя поверхность такого канала выстлана аминокислотными остатками молекулы белка, с которыми взаимодействуют диффундирующие ионы.

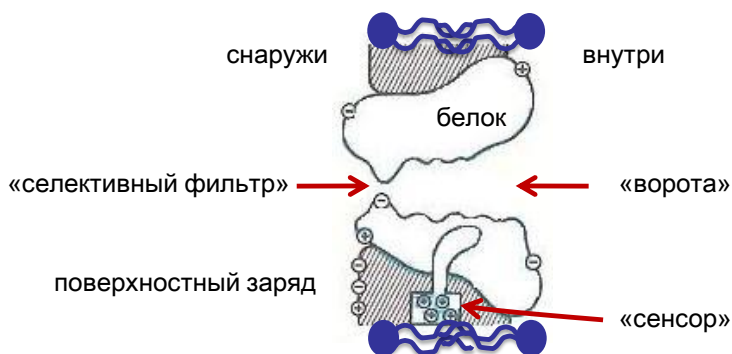


Рис. 21. Строение белкового ионного канала (по Б. Хилле, 1981 г.)

Некоторые биологически активные пептиды, размеры которых достаточны для того, чтобы перекрыть толщу мембраны, также формируют в мембране каналы, стенки которых покрыты аминокислотными остатками. Среди этих соединений наиболее изучены пептидный антибиотик аламецитин, меллитин, выделяемый из яда пчёл, и холерный токсин. Некоторые большие белки, попадая в мембрану, агрегируют, образуя группу из параллельно ориентированных друг другу, пронизывающих мембрану молекул. В центре этого агрегата располагается ионный канал (рис.22). Ассоциативно подобная структура напоминает бочонок и поэтому такую структуру канала называют бочкообразной.

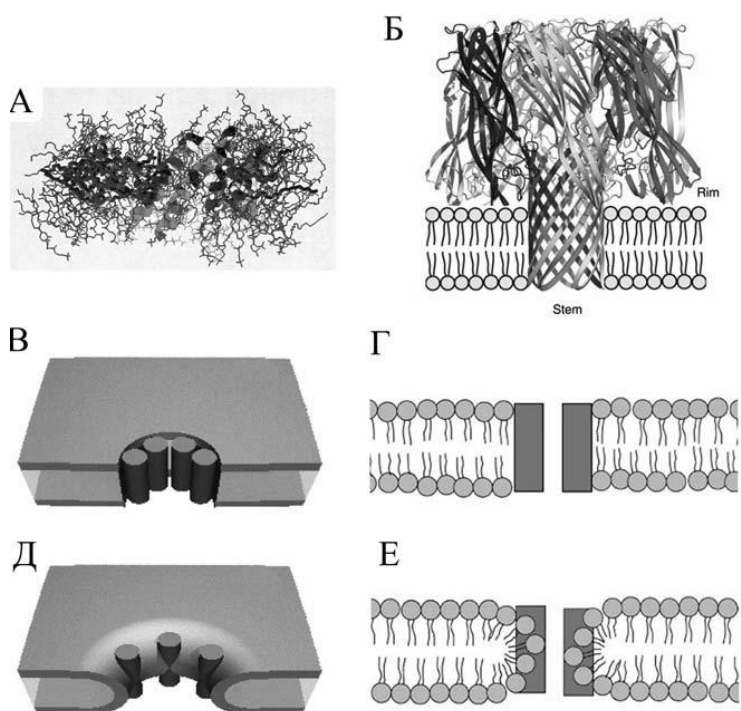


Рис. 22. Пора, образованная α -пороформирующим белком мелиттином и липидами (вид сбоку), изображена с использованием программы RasMol 2.6 (А).

Структура гептамерной поры, образованной β -пороформирующимся белком α -гемо лизинном *S. aureus* (вид сбоку) (Б). Указаны основные домены: stem – стеблевой, rim – краевой и sar –«кЭП»-домен .

Схематичное изображение «бочкообразной» поры в липидном бислое, вид сверху (В) и сбоку (Г) и тороидальной поры, вид сверху (Д) и сбоку (Е). Мономеры белка изображены в виде темных цилиндров (В, Д) и в виде темных прямоугольников (Г, Е) .

рисунок из обзора. «Пороформирующие белки и Адаптация организмов к условиям окружающей среды». Ж. И. Андреева-Ковалевская, А. С. Солонин, Е. В. Синева, В. И. Терновский. Успехи биологической химии, т. 48, 2008, с. 267–318

Благодаря агрегации некоторые пептиды, не имеющие размера, достаточного для того, чтобы соединить противоположные стороны мембраны, все же могут создавать каналы, которые можно отнести к чисто белковым каналам, так как их стенки выстланы аминокислотными остатками пептидных молекул. Примером такого канала служит канал, образуемый пептидным антибиотиком грамицидином А (рис.23). Грамицидин А является линейным полимером, состоящим из 15 L и D аминокислот с характерным чередованием L и D конфигурации: HCO-L-Val-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp-D-LeuL-Trp-NHCH₂CH₂OH.

В липидном бислое молекула грамицидина формирует πL⁶Dспираль, то есть спираль, у которой на шаг приходится 6 аминокислотных остатков. При этом гидрофобные остатки располагаются на внешней стороне спирали, а гидрофильные остатки внутри (модель α-спирали по Урри, 1971 г.). СО– радикалы L– аминокислот ориентированы вдоль спирали к С концу молекулы пептида, а соответствующие СО– группы D–аминокислотных остатков к N–концу. Длина такой спирали, ≈ 3 нм, примерно равна половине толщины мембраны, а просвет канала внутри спирали – 0,4 нм .

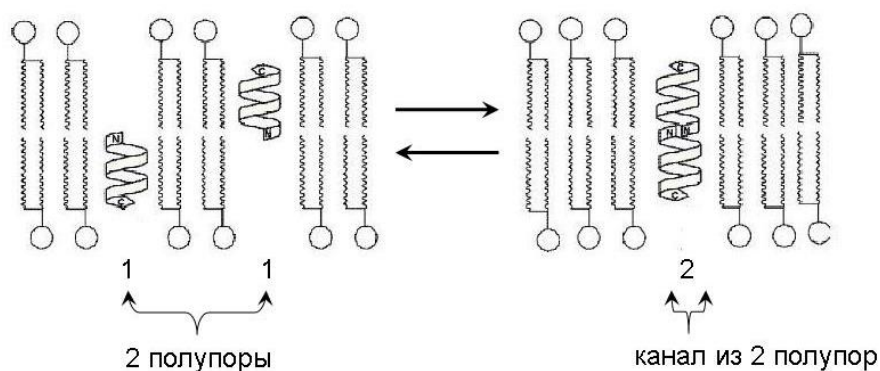


Рис.23. Образование канала из двух молекул пептидного антибиотика грамицидина А.

Две спирали, находящиеся в монослоях липидного бислоя мембран, могут соединиться вместе "голова к голове" (т.е. N-концами), образуя сквозной канал в мембране, как показано на рис. 23. Просуществовав некоторое время, канал распадается на две "полупоры" и молекулы грамицидина расходятся.

2 мономера → димер.

Подтверждением такого механизма образования и распада грамицидиновых каналов является квадратичная зависимость числа каналов (а следовательно, и проводимости мембраны) от концентрации грамицидина А в мембране:

$$K = \frac{k_1 \cdot M^2}{k_2 \cdot [D]},$$

где K – константа диссоциации канала, k_1 – константа скорости формирования каналов, k_2 – константа скорости их распада, $[M]$ и $[D]$ – концентрации мономеров и димеров грамицидина в мембране, соответственно. Внутренний диаметр канала равен диаметру спирали, 0,4 нм, достаточный для прохождения по нему ионов калия и цезия. При изучении зависимости тока в грамицидиновом канале от концентрации хлорида цезия наблюдается блокировка тока в канале при высокой концентрации соли, которая характерна для симметричного канала с двумя местами связывания.

4.2. Липидные каналы

Такие каналы, в первую очередь, обнаруживаются в модельных фосфолипидных мембранах (рис.24, 25).

Липидные каналы принято делить на гидрофобную пору и гидрофильную пору. Полагают, что гидрофобная пора существует неопределенно долгое время в липидном бислое мембран (Рис. 24). Стенки гидрофобной поры состоят из углеводородных цепей фосфолипидных молекул, ионам энергетически невыгодно находиться в таком канале, то есть гидрофобная пора не пропускает ионов и, следовательно, её нельзя обнаружить по появлению токовых флуктуаций, обусловленных проходом ионов через канал. Под влиянием некоторых физико-химических факторов, таких как температура, электрическое поле, Ca^{++} , pH, поликатионные молекулы, может осуществиться переход из гидрофобной поры в гидрофильную пору, стенки которой выстланы уже не углеводородными радикалами, а полярными группами фосфолипидов, способными взаимодействовать с водой и понижать свободную энергию иона за счет ион-ионных и ион-дипольных. То есть, по сути дела гидрофобную пору можно рассматривать как зачаток гидрофильной поры.

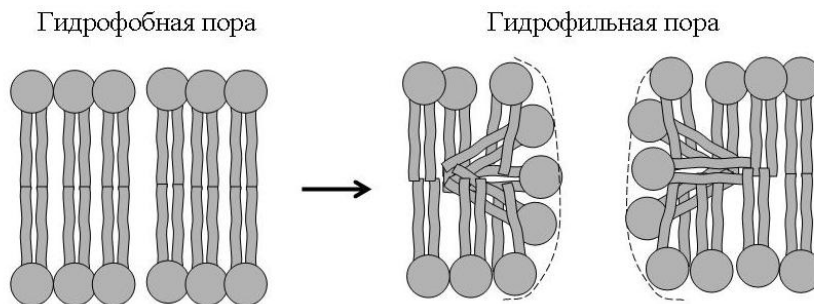


Рис. 24. Чисто липидные поры в липидных мембранах.

Чисто липидные ионные каналы обнаруживаются в мембранах при обратимом фазовом переходе мембранных фосфолипидов из твёрдого состояния в состояние жидкого кристалла (рис.25). Размеры этих каналов, по-видимому, сильно варьируют и изменяются во времени, так как регистрируемые флуктуации тока гетерогенны по амплитуде и в большинстве случаев имеют сглаженный задний фронт, в отличие от белковых каналов, имеющих постоянную структуру.

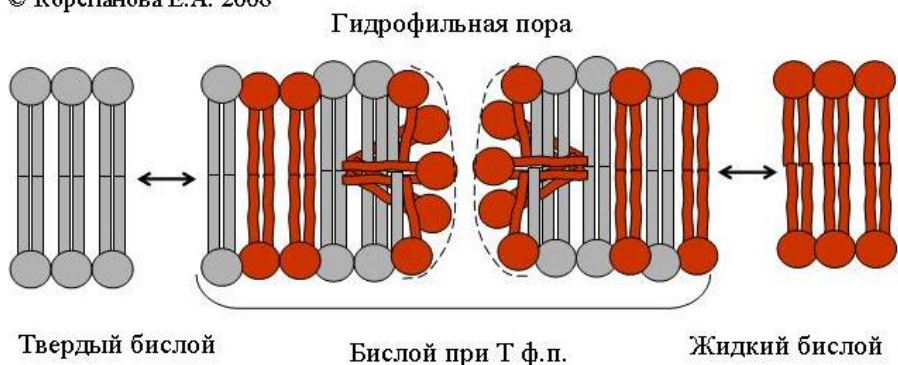


Рис. 25. Гипотетический механизм образования пор в фосфолипидной мембране при температуре их фазового перехода.

Вероятной причиной широкой вариабельности амплитуд флуктуаций тока является отсутствие жесткой структуры у возникающих дефектов, в формировании которых принимают участие агрегаты молекул в твердом и жидко-кристаллическом состоянии.

Некоторые исследователи полагают, что липидные каналы могут возникать при определенных условиях и в биологических мембранах.

4.3. Каналы смешанного типа

Представителями подобных соединений служат сходные по химической структуре противогрибковые полиеновые антибиотики (нистатин, амфотерицин В, леворин). Особенностью химической структуры полиеновых антибиотиков является наличие в их молекуле большого участка углеводородной цепи с 6 двойными связями и параллельного ему участка с 6 гидроксильными группами (рис.26).

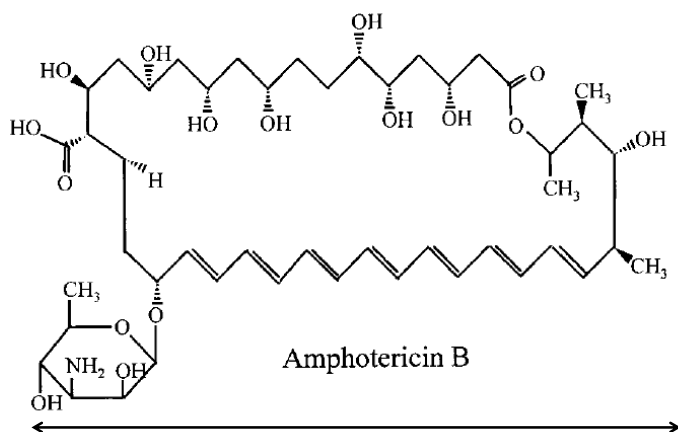


Рис. 26. Химическая структура амфотерицина В.

Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. GHANNOUM M.A., RICE B. L. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, 1999, Vol. 12, No. 4, p. 501-517

Полиеновые антибиотики имеют высокое сродство к стеринам. Полагают, что между стеринном и олефиновой частью молекулы возникает сильное гидрофобное взаимодействие и образуются водородная связь, приводящие к формированию прочного стерин–полиеновый антибиотик комплекса в виде палочки. Комплексы объединяются в

агрегаты, в центре которых располагается сквозная пора. При этом гидроксильные группы полиеновых молекул обращены внутрь канала, облегчая движение по нему воды и ионов (рис.27).

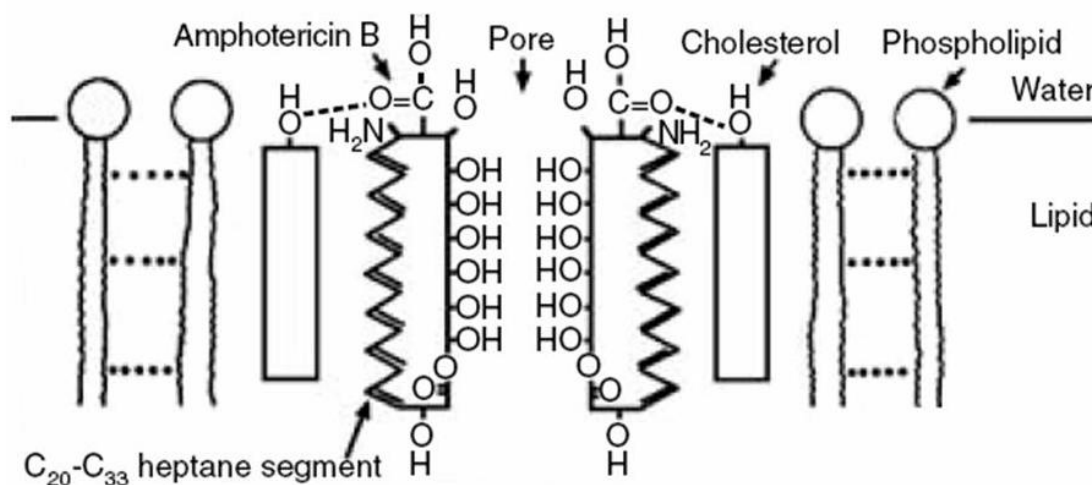


Рис. 27. Модель амфотерицин В–холестериновой поры. [Kidney International, Vol. 66, Supplement 91 (2004)].

Однако длина комплекса не всегда недостаточна для того, чтобы перекрыть толщину биологической мембраны – и тогда агрегаты плавают в мембране в виде полупор. В этом случае для образования сквозной поры необходимо наличие полупоры на противоположной стороне мембраны, при встрече с которой формируется канал (Рис.28).

Несмотря на то, что амфотерицин В связывается и с другими стеринами, эффективность его связывания с эргостерином в 10 раз выше, чем с холестерином, присутствующим во всех клеточных мембранах человека. Но поскольку мембрана грибов содержит преимущественно эргостерин, то полиеновые антибиотики оказались эффективными и малотоксичными для человека антигрибковыми препаратами. Интересно, что амфотерицин В может взаимодействовать с липидным бислоем и не содержащим стеринами (рис. 28). В этом случае способность антибиотика формировать в мембране каналы зависит от толщины образуемого бислоя, то есть от длины углеводородных цепей фосфолипидов.

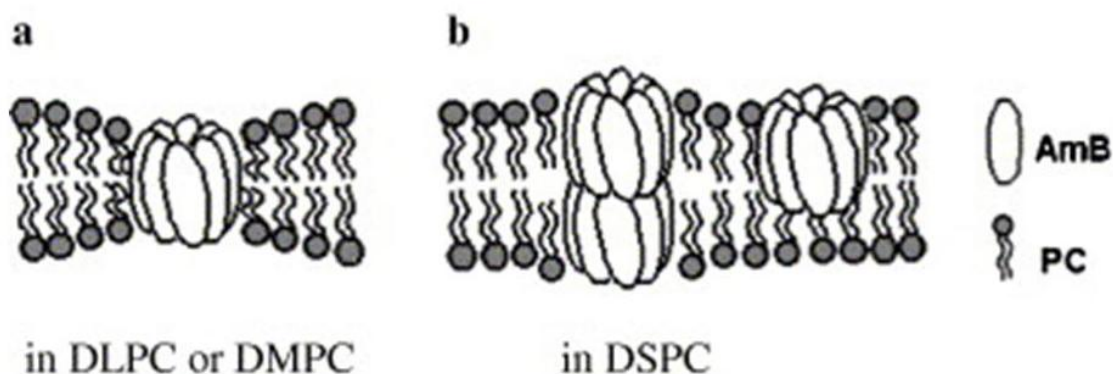


Рис.28. Взаимодействие амфотерицина В с липидным бислоем в зависимости от длины цепей фосфолипидов [Shigeru Matsuoka, Hiroki Ikeuchi, Yuichi Umegawa, Nobuaki Matsumori, Michio Murata. "Bioorganic and Medicinal Chemistry. V. 14, № 19, 2006, p.6608-6614]. а) DLPC или DMPC – дилаурил(C_{12}) или димиристоил (C_{13}) фосфатидилхолин. б) DSPC – дистеароил(C_{18}) фосфатидилхолин.

Если длина полупоры, образуемой молекулой амфотерицина, близка к толщине бислоя, то образуется пора без участия холестерина. На рисунке 28 а, показано образование такой поры в бислое из дилаурил ($C=12$ атомов углерода) – или димиристоилфосфатидилхолина ($C=13$ атомов углерода). В противном случае образование пор возможно только в том случае, если на противоположной стороне бислоя также присутствует амфотерицин В (рис. 28, б).

Биохимия и генетика устойчивости к полиенам изучена недостаточно, но имеющиеся данные в целом поддерживают гипотезу о снижении содержания эргостерола в цитоплазматической мембране устойчивых штаммов. Нистатин и амфотерицин В активны в отношении патогенных грибов, особенно грибов рода *Candida*. В, но не влияют на бактерии, не содержащие стерин.

В природе широко распространены высоко активные соединения пептидной природы, так называемые поликатионные пептиды, которые также способны формировать в мембране ионные каналы смешанного типа. Поликатионные пептиды имеют сравнительно небольшую молекулярную массу, не более 30 кДа, и обязательно несут от 2 до 10 положительных зарядов. Полагают, что данные вещества являются факторами неспецифической защиты организма хозяина от чужеродных для него клеток. Поликатионные пептиды обнаружены у всех, обследованных на их наличие, представителей животного и растительного мира, а также в организме человека.

В большинстве случаев длина молекулы поликатионного пептида недостаточна для перекрывания толщины мембраны. На поверхности мембраны поликатионные пептиды взаимодействуют, в первую очередь, с анионными фосфолипидами, образуя молекулярные комплексы, из которых формируются стенки канала (рис. 22,Е). Широкий канал, образуемый при этом, называется тороидальной порой.

Химическая структура поликатионных пептидов весьма переменна, поэтому для понимания механизма действия каждого из этих соединений требуется изучение этого механизма в каждом конкретном случае.

5. Заключение. Для чего нужно изучать каналы.

5.1 Каналы и болезни.

Управляемые каналы биологических мембран "открываются" и "закрываются" под действием различных физиологически активных веществ. Ослабление или усиление ионного потока вызывает изменение мембранного потенциала, что, в свою очередь, сказывается на многих физиологических процессах: скорости проведения нервного импульса, мышечном тонусе, терморегуляции, кровообращении, чувствительности к боли и т.д.

После обнаружения водного канала появилось основание думать, что помимо ионных каналов в биологических мембранах, вероятно, существуют и другие управляемые каналы, приспособленные к транспортировке некоторых других жизненно важных молекул.

Сбои в работе ионных каналов приводят к различным недомоганиям. В настоящее время стало ясно, что ряд заболеваний человека связано с врожденными или приобретенными нарушениями структуры и функции ионных каналов. Нарушение работы ионных каналов наблюдается в различных тканях, но чаще поражается скелетная мускулатура или центральная нервная система.

Наследственная патология ионных каналов - это группа заболеваний, обусловленных мутациями генов, кодирующих ионные каналы. Выяснилось, что патология натриевых каналов скелетных мышц вызывает гиперкалемический периодический паралич, врожденную парамитонию и миотонию, усиливающуюся приемом калия, злокачественную гипертермию и болезнь центрального стержня. Патология натриевых нейрональных каналов вызывает генерализованные фибриллярные судороги. Патология нейрональных калиевых каналов может вызывать семейные неонатальные судороги и периодическую атаксию тип 1. Патология нейрональных кальциевых каналов может вызывать эпизодическую атаксию тип 2, семейную гемиплегическую мигрень и спинальную атаксию тип 6. Патология хлорных каналов скелетных мышц может вызывать миотонию Томсона и Беккера. Таким образом, наследственные нарушения ионных каналов, которые поражают нервную систему и сердце лежат в основе заболеваний, ряд из которых имеет четкие клинические признаки. Для подтверждения диагноза в большинстве случаев проводится ДНК-диагностика.

Неудивительно, что вещества, влияющие на функционирование каналов, давно используются как лекарственные препараты для лечения эпилепсии, аритмии, а также как средства для местного обезболивания.

В мире существует большая проблема, особенно ярко выраженная в развивающихся странах, так называемая злокачественная трёхдневная лихорадка (злокачественная трёхдневная малярия, молниеносная трёхдневная малярия, римская лихорадка), обусловленная заражением малярийным плазмодием *Plasmodium falciparum*. По данным ВОЗ от этой болезни ежегодно умирает 1 миллион человек. Несмотря на громадный

Корепанова Е.А. 2016 ©

ущерб, приносимый этой инфекцией, вакцина от нее до сих пор не найдена. Проблема в том, что малярийный плазмодий относится к внутриклеточным паразитам. Он развивается и размножается внутри эритроцитов. Мембрана эритроцита защищает плазмодий от антибиотиков и других антибактериальных препаратов. Однако для развития паразита необходимы питательные вещества, присутствующие в плазме крови, для которых мембрана эритроцита малопроницаема, а их содержание внутри эритроцита недостаточно для развития плазмодия. Для устранения этого препятствия паразит увеличивает проницаемость мембраны хозяина для небольших органических молекул, необходимых для его жизнедеятельности, встраивая в мембрану эритроцитов собственный канал. Свойства этого анион селективного канала (PSAC: plasmodial surface anion channel) необычны и не укладываются в обычно используемую модель молекулярного сита. Дело в том, что канал пропускает необходимые для питания плазмодия органические молекулы, как заряженные, так и незаряженные, и не пропускает очень маленький по сравнению с ними неорганический ион натрия. Полученные данные позволяют предположить, что канал содержит два прохода: один широкий для органических молекул и второй, узкий, не пропускающий ион натрия (по расчетам отношение проницаемостей $p_{Na^+}/p_{Cl^-}=10^{-5}$).

При этом в изотоническом растворе хлорида натрия проводимость канала для ионов Cl^- также неожиданно маленькая < 3 пСм. Такой уровень исключения ионов из транспортного потока беспрецедентен для широких ионных каналов. Вероятно, он продиктован тем, что более высокая проницаемость для ионов натрия приведет к поглощению хлорида натрия, что в свою очередь приведет к осмотическому лизису инфицированных эритроцитов.

Присутствие данного канала обнаруживается в геноме и других видов малярийного плазмодия. Очевидно, что PSAC, является селективной молекулярной мишенью в мембране эритроцитов для создания эффективных антималярийных препаратов, ингибирующих активность этого канала. И действительно в модельных опытах с эритроцитами, инфицированными плазмодием, найдены эффективные ингибиторы, в присутствии которых инфицированные эритроциты подвержены гемолизу при их помещении в среду, вызывающей гемолиз неинфицированных эритроцитов. В настоящее время ведутся поиски ингибиторов PSAC, которые можно было бы использовать при лечении людей.

5.2. Каналы как антибиотики

К каждому антибиотику микроорганизмы рано или поздно приобретают резистентность, используя различные хитроумные пути. Поэтому ученые вынуждены непрерывно вести весьма трудоемкие и дорогостоящие исследования, создавая все новые препараты, способные преодолеть или обойти известные факторы резистентности. И этим поискам не видно конца. В этой связи вещества, которые образуют каналы и способны буквально за секунды устранить жизненно важные градиенты вещества и ионов, необходимые для сохранения баланса веществ и ионов в клетке, чрезвычайно интересны как потенциальные антибактериальные и противоопухолевые препараты. Дело в том, что мишенью действия каналобразующих соединений являются структурные элементы клеточной мембраны, а не отдельные ферменты, поэтому при формировании

устойчивости к ним должны произойти сложные генетические процессы, приводящие к изменению биосинтеза компонентов мембраны. На осуществление этих изменений требуется некоторое время, сравнимое со временем деления клетки (например, на деление *E.Coli* уходит около 20 минут). В то время как простой расчет показывает, что для устранения ионных градиентов на мембране клетки среднего размера достаточно секунды и одной поры нм диаметра. В связи с этим вероятность генетически приобретенной устойчивости к антибиотикам, формирующим каналы, относительно невелика, чем, по-видимому, и обусловлена низкая частота появления устойчивости к таким антибиотикам при их использовании в клинике.

Практически все организмы, включая микроорганизмы, синтезируют антимикробные пептиды (например, бактериоцины), которые подавляют или убивают отдельные виды микроорганизмов, обеспечивая тем самым определенное преимущество хозяину. Так, в случае перенаселенности каналоформеры используются микроорганизмами в процессах внутри- и межвидовой конкуренции в качестве антибиотиков. По своей структуре каналоформирующие белки и пептиды достаточно разнообразны, но их можно подразделить на два основных класса – α -спиральные и β -слойные. Причем, каналоформеры обоих классов синтезируются как про- так и эукариотами. Как правило, это – амфифильные молекулы, содержащие выраженный гидрофобный фрагмент, который непосредственно пронизывает мембрану. Зачастую полярная часть молекулы несёт положительно заряженные аминокислотные остатки от 2 до 11. Первый этап взаимодействия таких молекул с мембраной осуществляется за счет их электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными головками группировками на поверхности мембраны или высоко аффинного связывания со своими рецепторами. Затем, многие из них проходят стадию олигомеризации, процесс, который сопровождается структурными перестройками всего комплекса, усиливающими его гидрофобность.

После этого происходит проникновение гидрофобной части олигомера в гидрофобную область мембраны и открывается пора. Образующие поры можно разделить на два основных вида: бочкообразные, у которых внутренняя полость сформирована только белковыми мономерами, и тороидальные, у которых в выстилке проводящего пути дополнительно участвуют липидные молекулы мембраны (рис. 22). Внешний и внутренний диаметры сформированной подобным образом поры могут колебаться в широких пределах (1–200 нм), в зависимости от природы и числа образующих его мономеров. Поры сравнительно небольшого диаметра проницаемы преимущественно для ионов и низкомолекулярных компонентов. Основой их токсического действия является нарушение ионного гомеостаза клетки и ее осмотического баланса. В простейшем случае это приводит к лизису клеток и некрозу тканей. Однако даже если клетка способна противостоять осмотическому дисбалансу, увеличение в цитоплазме концентрации некоторых ионов, например Ca^{2+} , способно приводить к другим драматическим последствиям – запуску процессов экзоцитоза, эндоцитоза или апоптоза. Поры большого диаметра, проницаемые для белков, также используются не только для прямого лизиса клеток-мишеней, но и для транспорта в ее цитоплазму ферментов, что приводит, например, к нарушению синтеза белка в клетке или инициации апоптотических реакций.

Однако молекулярная структура подобных соединений весьма вариабельна и поэтому вариабелен механизм их мембранной активности.

Избирательность действия пороформирующих токсинов может варьировать в широких пределах: от полного ее отсутствия до высокой специфичности, связанной с наличием имеющих различную природу рецепторных структур. Ими могут быть липиды (холестерин, фосфатидилхолин и др.), мембранные белки (гликолипопротеины) или высокоспецифические белковые рецепторы. В зависимости от этого токсин может повреждать только прокариотические клетки либо только клетки эукариот, или же клетки определенных тканей. В связи с этим семейство белков, образующих каналы большого диаметра, является очень хорошим материалом для нано технологических конструкций.

Таким образом, совершенно очевидно, что создание новых антибиотиков не может быть успешным без сведений о характере их действия на клетки, с одной стороны, и их возможным токсическим действием, с другой стороны. Выяснение детальных механизмов избирательности того или иного каналоформера позволит, с применением методов генной инженерии, создавать токсины направленного действия, поражающие клетки-мишени преимущественно одного типа, что особенно актуально в отношении раковых клеток.

Кроме того, знание механизмов действия антибиотиков облегчает врачу понимание полезного и токсического влияния на организм и позволяет прогнозировать эффективность терапии. Неудивительно, что соединения, способные создавать в мембране, несвойственные ей каналы, привлекают внимание учёных как потенциальные антибиотики нового поколения, которые помогут разрешить или снизить остроту проблемы, обусловленной ростом числа устойчивых клинических штаммов бактерий.

5.3. Каналы и биотехнологии

В настоящее время усилилось внимание к природным и синтетическим соединениям, способным формировать каналы нано метрового размера (нанопоры) в различных технологических приложениях. В частности, как стохастические сенсоры для биомолекул и ионов металлов.

Принципы функционирования таких устройств кажутся простыми, молекулы, несущие электрический заряд, под действием электрического поля проходят через пору и блокируют ее физически, что приводит к регистрируемому изменению ее проводимости. Прохождение каждой молекулы может регистрироваться индивидуально. На этом принципе базируются широко известные счетчики Коултера. Примером подобной поры может быть пора, сформированная из α -гемолизина *S. aureus*. Эти поры, сформированные в модельных мембранах, практически постоянно находятся в высоко проводящем состоянии в широком диапазоне экспериментальных условий. Оказалось, что их можно успешно использовать для детектирования одно и двухцепочных молекул ДНК, поскольку они характеризуются разным временем прохождения через пору.

Нанопоры также могут быть использованы для контроля качества ДНК: короткие и длинные фрагменты ДНК при своем прохождении через канал по-разному модулируют его проводимость. На основании полученных данных несколько групп исследователей пытаются создать искусственные нанопоры, которые могут быть приспособлены для *de novo* автоматического определения последовательности нуклеотидов молекул ДНК и РНК.

Однако, в то время как поры, образованные стафилококковым альфа-гемолизинном обладают практически идеальными свойствами для детекции одноцепочечной ДНК, создание синтетических нано пор все еще сталкивается с большими трудностями.

Используя одиночный альфа-гемолизинный канал, группе авторов удалось создать «масс-спектрометр», достаточно достоверно определяющий молекулярную массу проходящих через пору молекул. Устройство основано на зависимости уровня проводимости одиночного канала от молекулярной массы транслоцируемых молекул (в том числе и не заряженных).

Альфа-гемолизинные поры были применены для создания везикулярного клетко-подобного биореактора, что позволило значительно увеличить количество экспрессированных белков. Клетко-подобным биореактором называют фосфолипидную везикулу (липосому), внутри которой находится система экспрессии *E. Coli*: раствор рибонуклеотидов и аминокислот. Однако работа такого биологического реактора останавливается через пару часов из-за исчерпания необходимых для синтеза соединений. Пороформирующий белок α -гемолизин *S. aureus*, экспрессируемый внутри везикул, сделал возможным поступление внутрь реактора через поры дополнительного количества необходимых для осуществления синтеза белка веществ и реактор продуцировал белок в течение до 4 дней и тем самым существенно увеличил выход белка.

Недавно нанопоры на основе модифицированного стафилококкового гемолизина были использованы для создания устройств, способных быстро обнаруживать азотистый иприт в концентрации менее 50 мкМ.

В качестве нано пор также пробовали использовать менее изученные порины из *E. coli* и ионный канал из *B. subtilis*, обладающие отличными от α -гемолизина свойствами [150]. Так, например, бактериальный ионный канал из *B. subtilis* имеет значительно больший диаметр, что позволило использовать его для транслокации двухцепочечной ДНК плазмиды 4.2 kb и регистрации изменения сопротивления канала в результате её транслокации. Белок наружной мембраны *E. coli* порин OmpF, образующий тримерную пору диаметром 1.0–1.2 нм был использован для детекции водорастворимых полимеров типа полиэтилен гликоля. Интересным представляется также использование механо-чувствительных каналов *E. Coli* : MscL и MscS, которые обладают рядом свойств, позволяющих повысить чувствительность биосенсоров в будущем.

Антимикробные пептиды уже используются в медицине в качестве антибиотических препаратов.

Также предполагается использование в медицине термочувствительных пор, которые были получены путем введения эластин подобного полипептида в структуру гептамера (« β -сэндвич»-домен), образованного стафилококковым альфа-гемолизинном. Петля эластин подобного полипептида выступает внутрь канала, и в зависимости от температуры либо не блокирует ионный поток, так как свернута, либо разворачивается и полностью блокирует проводимость канала. Этот процесс обратимый. Температура перехода петли из одного конформационного состояния в другое приблизительно 40°C. При температуре ниже температуры перехода полипептид развернут, а выше – свернут. Такие поры могут быть встроены в липосомы и использоваться для контролируемого температурой

высвобождения лекарств из липосом или встроены в клетки для контролируемого введения веществ в них.

Активное исследование свойств белков, образующих поры, может в будущем привести к созданию совершенно новых устройств с принципиально новыми свойствами.

5.4. Каналы как необходимый механизм выживания

Трудно описать всех выявленных к настоящему времени представителей каналоформирующих белков. Практически все живые существа от вирусов до млекопитающих (включая человека) синтезируют в своем организме эти соединения и активно используют их для выживания. В зависимости от «специализации» живого организма каналы могут выполнять различные функции.

Особенно следует отметить, что белковые и полипептидные каналы являются важным компонентом иммунной системы. Например, пороформирующие цитотоксические вещества, продуцируемые лейкоцитами, перфорины и дефенсины, являются эффективной первоначальной защитой организма от проникновения внутрь его чужеродных организмов. У прокариот пороформирующие токсины также выполняют сходные функции.

Многие организмы используют их для защиты от внешних врагов и в частности как антимикробные агенты. Практически все организмы, включая микроорганизмы, синтезируют антимикробные пептиды (например, бактериоцины), которые приводят к изменению состава окружающей микрофлоры, подавляя или убивая отдельные виды микроорганизмов, обеспечивая тем самым себе определенное преимущество. Так, в случае перенаселенности каналоформеры используются микроорганизмами в процессах внутри- и межвидовой конкуренции в качестве антибиотиков.

Хищники, вырабатывающие яд, применяют каналы с большого диаметра (пороформеры) для обездвиживания и умерщвления добычи. Часто тот же компонент яда используется ими для обеззараживания поглощаемой жертвы от патогенных микроорганизмов. Бактерии, лизирующие клетки хозяина, получают доступ к питательным веществам, необходимым для их собственного метаболизма, а разрушение тканей и органов открывает микроорганизмам дополнительное пространство для размножения и распространения.

Интересно, что организмы, невероятно далеко отстоящие друг от друга на эволюционной лестнице, используют пороформеры сходного механизма действия, примером могут служить дифтерийный токсин и перфорины иммунной системы млекопитающих. Это прямо указывает на универсальность этих способов защиты и нападения, получения питательных веществ и распространения в пространстве все, что можно определить общим термином адаптация к условиям

Учебная литература:

- Рубин А.Б. Биофизика в 3 томах: Том 2. Биофизика клеточных процессов. Биофизика мембранных процессов. Москва Ижевск 2013.

- Джаксон.М. Молекулярная и клеточная Биофизика. Москва «Мир». Перевод на русский язык. 2012

Научная литература:

- Ж. И. Андреева-Ковалевская, А. С. Солонин, Е. В. Синева, В. И. Терновский. «Пороформирующие белки и адаптация организмов к условиям окружающей среды». Успехи биологической химии, т. 48, 2008, с. 267–318
- Abdullah A.B. Bokhari, Tsione Solomon, and Sanjay A. Desai. «Two Distinct Mechanisms of Transport through the Plasmodial Surface Anion Channel» .J Membr Biol. 2008 ; 226(1-3): 27–34. doi:10.1007/s00232-008-9136-2.
- Ajay D. Pillai, Margaret Pain, Tsione Solomon, Abdullah A. B. Bokhari, and Sanjay A. Desai . «A Cell-Based High-Throughput Screen Validates the Plasmodial Surface Anion Channel As an Antimalarial Target». Mol Pharmacol 77:724–733, 2010.